N° 41. **R. Scheurer** und **M. Lüscher,** Bern — Nachweis der Synthese eines Dotterproteins unter dem Einfluss der Corpora allata bei *Leucophaea maderae*.[1] (Mit 4 Textabbildungen)

Abteilung für Zoophysiologie, Zoologisches Institut der Universität Bern.

Für verschiedene Insektenarten ist nachgewiesen worden, dass sich die Konzentration und die qualitative Zusammensetzung der Hämolympheproteine im Verlaufe der Eireifungsphase ändert, z.B. *Hyalophora cecropia* (Telfer und Williams, 1953), *Schistocerca gregaria* (Hill, 1962), *Rhodnius prolixus* (Coles, 1964, 1965). Bei *Leucophaea* nimmt der Proteinspiegel der Hämolymphe zu Beginn der 2. Eireifungsphase zu, fällt dann während der Dotterbildung in den Oocyten signifikant ab und erreicht bei der Ovulation einen minimalen Wert (Abb. 1). Es ist nun naheliegend, anzunehmen, dass die Abnahme der absoluten Proteinkonzentration der Hämolymphe durch eine Einlagerung von Blutproteinen in die Oocyten bewirkt wird, was bereits für einige Insektenarten mit verschiedenen Methoden nachgewiesen worden ist, z.B. *Hyalophora cecropia* (Telfer und Rutberg, 1960), *Calliphora erythrocephala* (Bier, 1962), *Panorpa communis* (Ramamurty, 1964). Bei *Leucophaea* ist, wie bei den meisten andern Insekten, die Eireifung von aktiven Corpora allata abhängig. Man kann sich nun fragen, in welcher Weise die Corpora allata die Eireifung beeinflussen. Da nun die Konzentration der Hämolympheproteine zu Beginn der Eireifungsphase zunimmt (Abb. 1), ist es denkbar, dass ein Hormon der Corpora allata die Synthese von Hämolympheproteinen stimuliert. Andererseits ist es nicht ausgeschlossen, dass die Corpora allata für den Einbau von Proteinen in die Oocyten notwendig sind. Die Frage der Wirkung der Corpora allata auf die Synthese von Hämolympheproteinen und auf die Einlagerung derselben in die Oocyten haben wir mit der Disc-Elektrophorese auf Acrylamid (Methode nach Davies, 1964) untersucht. Ferner wurde elektronen-mikroskopisch geprüft, ob die Oocytenoberfläche für die vermutete Einlagerung von Hämolympheproteinen in die Oocyten organisiert ist.

Unsere qualitativen Proteinbestimmungen haben ergeben, dass in der zellfreien Hämolymphe der *Leucophae*weibchen zu jedem Zeitpunkt der Eireifungsphase mindestens acht mit Amidoschwarz färbbare Proteinfraktionen vorhanden sind (Abb. 2). Die Proteinfraktion G (Abb. 2) ist nur in den Weibchen und nur während der Eireifung nachweisbar. Es dürfte sich demnach bei diesem Protein

[1] Durchgeführt mit Hilfe des Forschungskredites N° 3711 des Schweiz. Nationalfonds.

um ein sog. „ female protein " handeln, wie es durch TELFER (1954) für *Cecropi* beschrieben worden ist. Aus dem Vergleich der Proteinbandenmuster in gleich zeitig hergestellten Gelen mit Hämolymphe, Ovarhomogenat und einer Misch lösung der beiden ist zu schliessen, dass in den Ovarhomogenaten Proteinfrak tionen vorhanden sind, die sich in bezug auf ihre Wanderung im elektrische

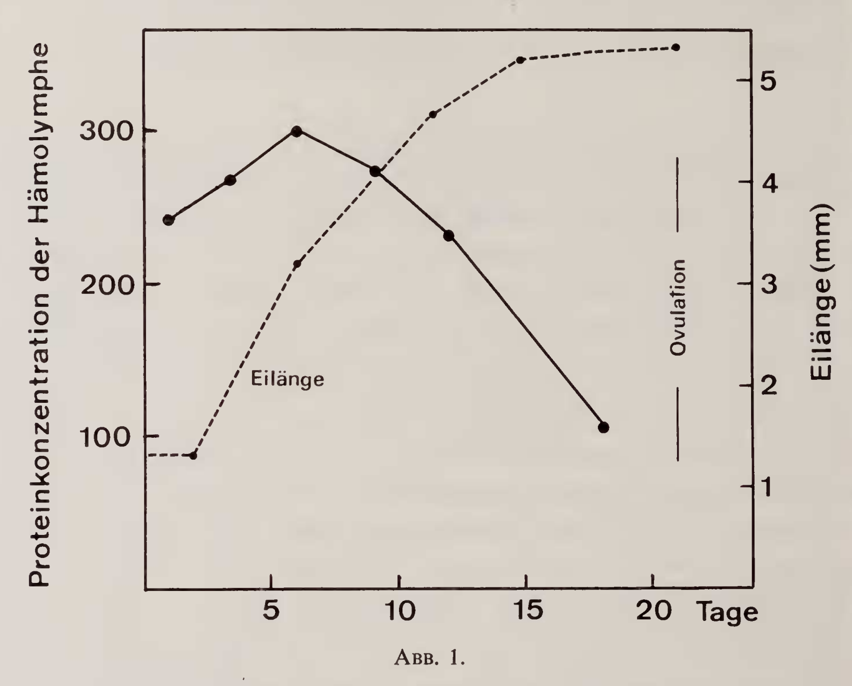


ABB. 1.

Konzentration der Gesamtproteine in der Hämolymphe während der Eireifungsphase; Durchschnittswerte in Densitometereinheiten.

Feld gleich verhalten wie bestimmte Blutproteine (Abb. 2). Mit einiger Sicherheit darf angenommen werden, dass die Fraktion G in den Ovarhomogenaten und in der Hämolymphe identisch ist, da sie sich in beiden Lösungen nicht nur mit Amidoschwarz, sondern auch mit Sudanschwarz färben lässt. Diese Befunde bestätigen grundsätzlich die Ergebnisse serologischer Untersuchungen von ENGELMANN und PENNEY (1966), welche gezeigt haben, dass von den sechs Antigenen der Hämolymphe deren fünf auch in den Oocyten nachweisbar sind.

Die Konzentration der Fraktion G nimmt in den Ovarhomogenaten bis zum 10. Tag zu und während der zweiten Hälfte der Eireifungsphase wieder ab (Abb. 3). Diese Konzentrationsabnahme ist möglicherweise bedingt durch eine Umwandlung des Proteins G in eine unlösliche Form im Verlaufe der Dotterbildung. Interessant ist die Feststellung, dass das „ female protein " kurz nach Beginn der Eireifungsphase den grössten Anteil (22 %) der löslichen Proteine in

den Ovarien ausmacht. Die während der Eireifungsphase beobachteten Konzentrationsänderungen des Proteins G in der Hämolymphe lassen nicht direkt auf dessen Einlagerung in die Oocyten schliessen. Die absolute Konzentration nimmt praktisch während der ganzen Phase der Dotterbildung zu, eine Konzentrationsabnahme kann erst kurz vor der Ovulation beobachtet werden. Es muss

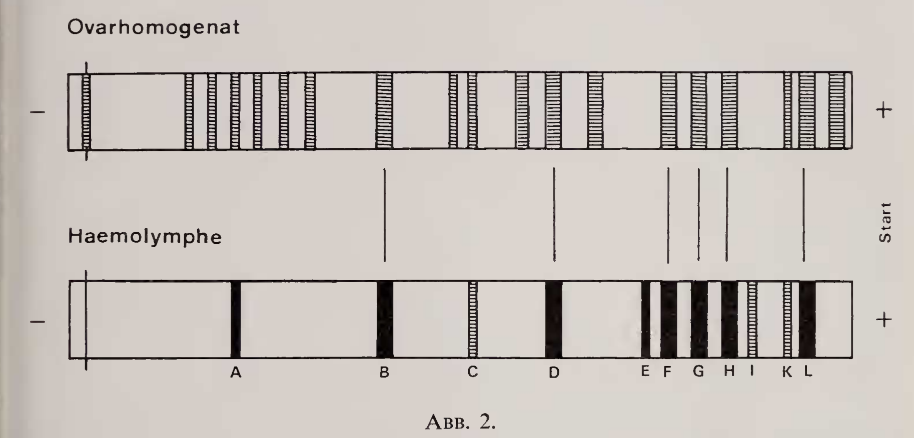


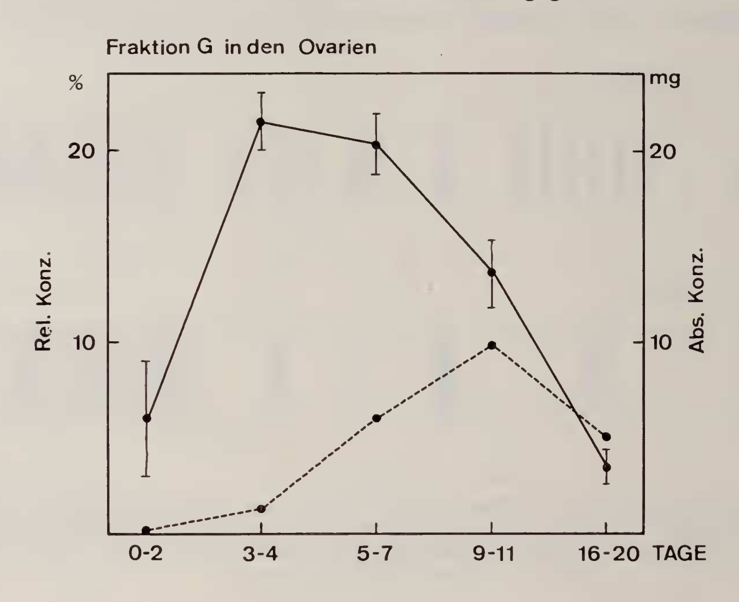
Abb. 2.

Die Proteinbandenmuster der Hämolymphe von Weibchen und von Ovarhomogenaten, nach elektrophoretischer Trennung auf Acrylamidgelen und anschliessender Färbung mit Amidoschwarz. Die schwarz dargestellten Hämolymphefraktionen sind zu jedem Zeitpunkt der Eireifungsphase vorhanden.

daher angenommen werden, dass das Protein G während der Eireifungsphase laufend synthetisiert und von den Oocyten aufgenommen wird.

Die Tatsache, dass die Proteinfraktion G nur in der Hämolymphe der Weibchen und nur während der Eireifungsphase nachzuweisen ist, lässt vermuten, dass die Synthese dieses Proteins durch ein Hormon der Corpora allata ausgelöst wird. Ein Einfluss der Corpora allata auf die Proteinsynthese allgemein und speziell auf die Synthese von Hämolympheproteinen ist bereits für verschiedene Insektenarten nachgewiesen worden, z.B. *Rhodnius prolixus* (Coles, 1964, 1965), *Periplaneta americana* (Thomas und Nation, 1966), *Nauphoeta cinerea*(Lüscher, 1968). Zur Prüfung dieser hormonalen Steuerung wurden Weibchen unmittelbar nach der Ablage dekapitiert. Danach wurden in diese Weibchen aktive Corpora allata aus fünftägigen Tieren implantiert. Als Kontrolltiere dienten Weibchen, die während der Versuchsperiode weder Trinkwasser noch Nahrung zur Verfügung hatten. Die quantitative Analyse von sechs Fraktionen der Hämolympheproteine erfolgte nach sieben Tagen. Die Ergebnisse zeigen, dass bei den dekapitierten Weibchen die Konzentrationen der untersuchten Fraktionen niedriger sind als bei den Kontrolltieren. Die Proteinfraktion G ist in den dekapitierten Weibchen nicht nachweisbar. Dagegen ist sie in sämtlichen Versuchstieren mit implantierten Corpora allata vorhanden. Die durchschnittliche Kon-

zentration ist sogar höher als bei den Kontrolltieren. Die Konzentrationen d weiteren untersuchten Fraktionen sind nicht signifikant von denjenigen b dekapitierten Tieren verschieden. Andere implantierte Kopforgane vermochte die Synthese der Fraktion G nicht auszulösen. Hingegen wurde die Synthe



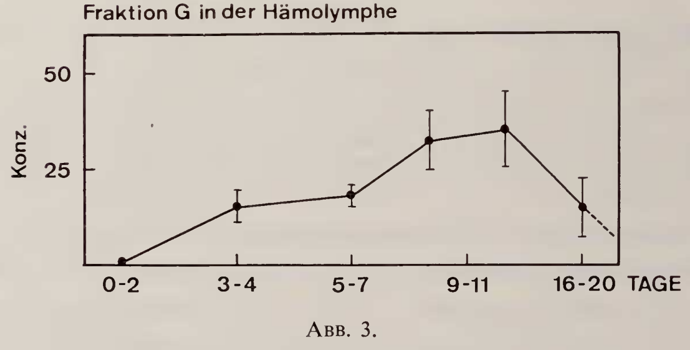


Abb. 3.

Die Konzentrationsänderungen der Proteinfraktion G in den Ovarien und in der Hämolymph während der Eireifungsphase.
Obere Darstellung: Ausgezogene Linie: Anteil der Fraktion G an der Gesamtproteinkonzentration in Prozenten. Gestrichelte Linie: Absolute Menge der Fraktion in mg pro zwei Ovarien (Durchschnittswerte).
Untere Darstellung: Konzentration von G, angegeben in Densitometereinheiten.

der weitern 5 Fraktionen durch implantierte Corpora cardiaca und Gehirne stimuliert. Hierüber soll an anderer Stelle berichtet werden.

Im Weitern interessierte nun die Frage, ob die Oocytenoberfläche für die Aufnahme von Makromolekülen, wie sie die Hämolympheproteine darstellen

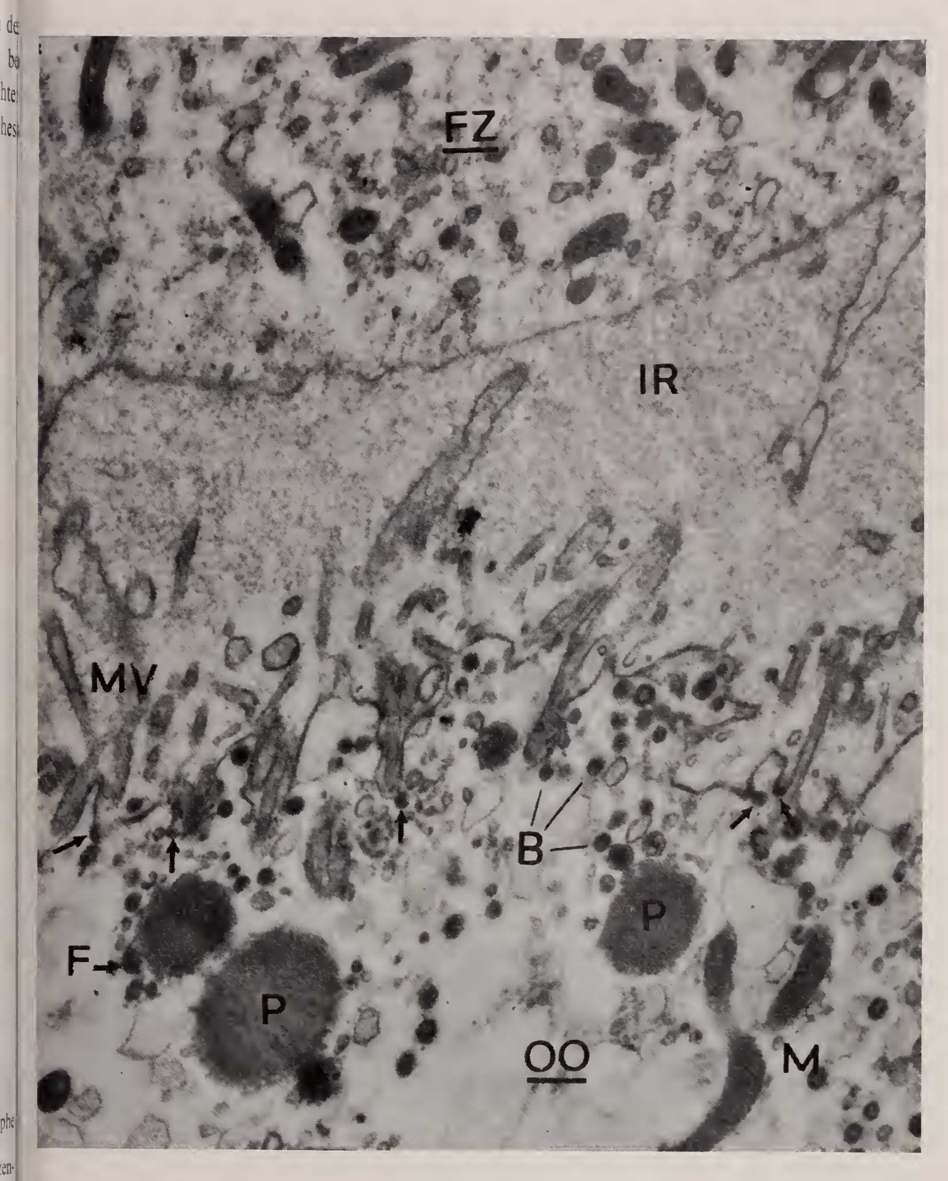


ABB. 4.

Die EM-Aufnahme zeigt einen Teil der Randzone einer Oocyte (00) zur Zeit der Dotterbildung. In den grossen Interzellularraum (IR) ragen Fortsätze einer Follikelepithelzelle (FZ) und zahlreiche Mikrovilli (MV) der Oocyte hinein. In der Oocytenmembran sind einige, von einem dichten Material ausgefüllte Einsenkungen, sog. " pits " (Pfeile), zu erkennen. Diese werden von der Membran abgeschnürt und treten in der corticalen Zone des Ooplasmas als Bläschen (B) in Erscheinung. Die Fusion eines Bläschens mit einem grössern Proteingranulum (P) ist in einem Fall sichtbar (F). M = Mitochondrien. Vergrösserung 22'000 ×.

organisiert ist; die Ergebnisse unserer physiologischen Untersuchungen schliessen die Möglichkeit nicht aus, dass die Proteine, welche für die Dotterbildung gebraucht werden, in der Oocyte selbst oder in den Follikelzellen synthetisiert werden und gar nicht aus der Hämolymphe stammen. Unsere elektronenoptischen Untersuchungen zeigen jedoch, dass weder die Oocyte noch die Follikelzellen spezielle Zellorganelle, z.B. Golgi-Komplexe, mit Ribosomen besetzte Lamellenstrukturen des endoplasmatischen Reticulums oder Sekretgranula in der Menge enthalten, wie sie normalerweise in sekretorisch aktiven Zellen gefunden werden. Dagegen weist die Struktur der Oocytenoberfläche eindeutig darauf hin, dass während der Dotterbildung gewisse Stoffe, wahrscheinlich Hämolympheproteine, durch Mikropinocytose ins Ooplasma aufgenommen werden (Abb. 4). In der Membran der reifenden Oocyte sind zahlreiche Einsenkungen, sog. „pits", zu erkennen, welche ein elektronenoptisch dichtes Material enthalten. In der cortikalen Zone der Oocyte sind viele Bläschen von ca. 80 mμ Durchmesser vorhanden, die entsprechend ihrer morphologischen Ähnlichkeit mit den „pits" aus diesen entstanden sein dürften. Die grösseren, von einer Membran umgebenen Proteingranula, entstehen wahrscheinlich durch Fusion der 80 mμ-Bläschen. Die hier beschriebenen morphologischen Befunde entsprechen denjenigen von Kessel und Beams (1963) an *Lygaeus kalmii*, Roth und Porter (1964) an *Aedes aegyptii*, Anderson (1964) an *Periplaneta americana* und Stay (1965) an *Hyalophora cecropia*.

Résumé

L'hémolymphe de la femelle de *Leucophaea* contient pendant la maturation des ovocytes une „protéine femelle" qui ne se trouve pas chez le mâle. Cette protéine est absorbée par les ovocytes durant la vitellogenèse et devient insoluble, sans que son taux baisse d'une façon correspondante dans l'hémolymphe: elle est donc synthétisée continuellement. Cette synthèse dépend de la présence des corpora allata. Au microscope électronique, on ne décèle pas de synthèse des protéines dans les ovocytes ni dans les cellules folliculaires, mais on voit que les protéines de l'hémolymphe peuvent être absorbées par les ovocytes, par micropinocytose.

Summary

In the haemolymph of *Leucophaea* females, at least 8 protein fractions could be demonstrated during oocyte growth by disc electrophoresis on acrylamide gels. A fraction G (Fig. 2) could only be detected during oocyte maturation. It was absent in the haemolymph of males; it is therefore referred to as „female protein". From a comparison of protein patterns in gels on which haemolymph

and ovary homogenate were simultaneously electrophorized, it follows that some of the haemolymph proteins are taken up by the oocytes during vitellogenesis. Shortly after the beginning of maturation, the female protein makes up the highest proportion of the soluble proteins in the ovaries; it seems to become insoluble in the course of yolk formation. Since the changes in the concentration of the female protein in the haemolymph do not reflect its uptake into the oocytes it is assumed that it is synthesized continually during the egg maturation period. The female protein is absent in decapitated females, but present in a high concentration in decapitated females with implanted corpora allata. Therefore a hormone released by the corpora allata is responsible for the synthesis of this protein. Electron microscopical studies provide no evidence for protein synthesis in the oocyte or in the follicle cells but they show that haemolymph proteins may be taken up into the oocytes by micropinocytosis.

LITERATURVERZEICHNIS

Adiyodi, K. G. 1967. *The nature of haemolymph proteins in relation to the ovarian cycle in the viviparous cockroach Nauphoeta cinerea.* J. Insect Physiol. 13: 1189-1195.

Anderson, E. 1964. *Oocyte differentiation and vitellogenesis in the roach Periplaneta americana.* J. Cell. Biol. 20: 131-155.

Bier, K. 1962. *Autoradiographische Untersuchungen zur Dotterbildung.* Naturwiss. 49: 332-333.

Coles, G. C. 1964. *Some effects of decapitation on metabolism in Rhodnius prolixus Stål.* Nature, Lond. 203: 323.

— 1965. *Haemolymph proteins and yolk formation in Rhodnius prolixus Stål.* J. Exp. Biol. 43: 425-431.

Engelmann, F. und O. Penney. 1966. *Studies on the endocrine control of metabolism in Leucophaea maderae (Blattaria). I. The haemolymph proteins during egg maturation.* Gen. and Comp. Endocrinol. 7: 314-325.

Davies, B. J. 1964. *Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins.* Ann. N.Y. Acad. Sci. 121: 404-427.

Hill, L. 1962. *Neurosecretory control of haemolymph protein concentration in the desert locust.* J. Insect Physiol. 8: 609-619.

Kessel, R. G. und H. W. Beams. 1963. *Micropinocytosis and yolk formation in the oocytes of the small milkweed bug.* Exp. Cell. Res. 30: 440-443.

Lüscher, M. 1968. *Hormonal control of respiration and protein synthesis in the fat body of the cockroach Nauphoeta cinera during oocyte growth.* J. Insect Physiol. 14: 499-511.

Ramamurty, P. S. 1964. *On the contribution of the follicle epithelium to the deposition of yolk in the oocyte of Panorpa communis.* Exp. Cell. Res. 33: 601.

Roth, F. F. und K. R. Porter. 1964. *Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito Aedes aegyptii L.* J. Cell. Biol. 20: 313-331.

Stay, B. 1965: *Protein uptake in the oocytes of the cecropia moth.* J. Cell. Biol. 26: 49-62.

TELFER, W. H. 1954. *Immunological studies of insect metamorphosis. II. The role of a sex-limited blood protein in egg formation by the cecropia silkworm.* J. Gen. Physiol. 37: 539-558.

— und C. M. WILLIAMS. 1953. *Immunological studies of insect metamorphosis. I. Qualitative and quantitative changes in the blood antigens of the cecropia silkworm.* J. Gen. Physiol. 36: 389-413.

— und L. D. RUTBERG. 1960. *The effects of blood depletion on the growth of the oocytes in the cecropia moth.* Biol. Bull., Woods Hole, 118: 352-366.

THOMAS, K. K. und J. L. NATION. 1966. *Control of a sex-limited haemolymph protein by corpora allata during ovarian development in Periplaneta americana (L).* Biol. Bull., Woods Hole, 130: 254-264.